

PRODUCTION OF SACCHARIDE AND COMPLEX SACCHARIDE

Patent Number: JP7059587
Publication date: 1995-03-07
Inventor(s): TOCHIKURA TATSUROKURO; others: 03
Applicant(s):: KIRIN BREWERY CO LTD; others: 01
Requested Patent: ☐ JP7059587
Application Number: JP19930209752 19930824
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P19/26 ; C12N9/24
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To obtain a saccharide or a complex saccharide having improved physicochemical or physiological properties such as stability and cell recognition property by carrying out the rearrangement reaction of sugar chains in the presence of endo-beta-N-acetylglucosaminidase M.

CONSTITUTION: Rearrangement reaction expressed by the formula $A\text{-GlcNAc-C} + D\text{-A-GlcNAc-D} + C$ (A is saccharide; GlcNAc is N-acetylglucosamine; C and D are independently saccharide, complex saccharide) is carried out in the presence of endo-beta-N-acetylglucosaminidase M. This process enables the rearrangement of any of the high-mannose type, mixed type and complex type chain in the case of asparagine-bonded sugar chain.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-59587

(43)公開日 平成7年(1995)3月7日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/26		7432-4B		
C 1 2 N 9/24		9152-4B		
// (C 1 2 N 9/24				
C 1 2 R 1:645)				

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平5-209752

(22)出願日 平成5年(1993)8月24日

(71)出願人 000253503
麒麟麦酒株式会社
東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号
(71)出願人 591038141
寶酒造株式会社
京都府京都市伏見区竹中町609番地
(72)発明者 栃倉 辰六郎
京都府向日市上植野町野上山31-12
(72)発明者 熊谷 英彦
滋賀県大津市日吉台3丁目32-2
(72)発明者 門脇 節
京都府京都市右京区御室芝橋町2
(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

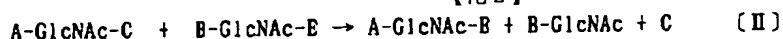
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 糖質又は複合糖質の製造方法

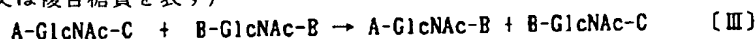
(57)【要約】

【構成】 エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼM
の存在下、次式〔I〕、〔II〕又は〔III〕:

【化1】

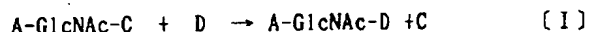


(式中、A及びBは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサ
ミン、C及びEは糖質又は複合糖質を表す)



(式中、A及びBは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサ
ミン、C及びEは糖質又は複合糖質を表す)で示される
転移反応を行なうことを特徴とする糖質又は複合糖質の
製造方法。

【効果】 本発明により、エンド-β-N-アセチルグルコ



(式中、Aは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、
C及びDは糖質又は複合糖質を表す)

【化2】

【化3】

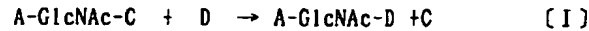
サミニダーゼMの触媒作用を利用して従来の技術では困
難であった種々多様な糖鎖を転移することが可能な、糖
質および複合糖質のリモデリング法を提供することがで
き、副作用の少ない医薬品などの開発、生産等に利用で
きることから、産業上極めて有用である。

BEST AVAILABLE COPY

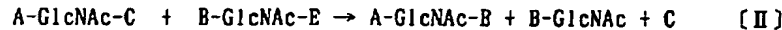
【特許請求の範囲】

【請求項1】 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼMの存在下、次式〔I〕：

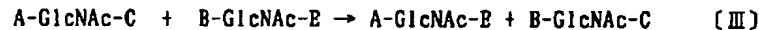
【化1】



（式中、Aは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、



（式中、A及びBは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、C及びEは糖質又は複合糖質を表す）で示される転移反応を行なうことを特徴とする糖質又は複合糖質の製造方法。



（式中、A及びBは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、C及びEは糖質又は複合糖質を表す）で示される転移反応を行なうことを特徴とする糖質又は複合糖質の製造方法。

【請求項4】 複合糖質が、糖タンパク質、糖脂質又はプロテオグリカンである請求項1、2又は3記載の糖質又は複合糖質の製造方法。

【請求項5】 糖質又は複合糖質に転移される糖鎖がアスパラギン結合型である請求項1、2又は3記載の糖質又は複合糖質の製造方法。

【請求項6】 糖質又は複合糖質に転移される糖鎖がアスパラギン結合型であって、その糖鎖が混成型又は複合型であることを特徴とする請求項5記載の糖質又は複合糖質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼMの糖転移活性を利用して、糖質または複合糖質に糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖などの糖鎖を転移し、糖質又は複合糖質をリモデリングする方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 糖質及び複合糖質（糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカン）は、動物、植物、昆虫、微生物など広範囲な生物で見いだされている。糖質は細胞骨格物質やエネルギー源など、また、複合糖質は細胞接着、細胞認識、細胞間情報伝達などに関与する物質で、生物において非常に重要な機能をもっていることが知られている。

【0003】 一方、最近エリスロポエチン、インターフェロンなど多くの糖タンパク質性の医薬品において糖鎖構造が薬物動態に大きく影響していることが明らかにされつつある。現在、糖タンパク質性の医薬品の中には微生物や動物細胞を用いて大量生産しているものがあるが、糖鎖構造が異なるために体内動態や安定性に問題がかえ、大量投与や副作用の原因となっているものがある。従って、糖鎖構造を変えることにより、体内動態や安定性の改善を図った糖タンパク質性の医薬品を生産す

C及びDは糖質又は複合糖質を表す）で示される転移反応を行なうことを特徴とする糖質又は複合糖質の製造方法。

【請求項2】 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼMの存在下、次式〔II〕：

【化2】

【請求項3】 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼMの存在下、次式〔III〕：

【化3】

ることが期待される。

【0004】 アスパラギン結合型糖鎖は、ポリペプチドのアスパラギン残基に結合している糖鎖で、数個から数十個の種々の糖が多様に結合した複雑な構造となっている。この糖鎖は、高マンノース型、混成型、複合型に大別され、特に複合型糖鎖は、動物でよく見いだされる糖鎖構造であり、生体内で重要な生理機能を担っていることが知られている。アスパラギン結合型糖鎖の種類について、図1に高マンノース型、図2に混成型、図3に複合型の1分枝型、図4に複合型の2分枝型、図5に複合型の3分枝型、図5に複合型の4分枝型を示す。

【0005】 アスパラギン結合型糖鎖は様々な多数の糖から構成されているので、これを得るために有機合成的手段を用いたのでは、糖を逐次的に結合する反応が必要であり、大変煩雑である。従って、糖鎖そのものを簡便な方法で変換（リモデリング）する方法が必要とされている。このような方法として、R.B.トリムブルらは、フラボバクテリウム メニンゴセプチカム（*Flavobacterium meningosepticum*）由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ（以下、エンドFとする）を用いた方法を報告し〔ジャーナルオブ バイオロジカル ケミストリー（*J. Biol. Chem.*）、第261巻、第12000～12005頁（1986）〕、K.タケガワらは、アルスロバクター プロトホルミエ（*Arthrobacter protophormiae*）由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ（以下、エンドAとする）を用いた方法を報告している（特開平5-64594号公報）。

【0006】 これらは、いずれも本来糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖を切断するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの糖転移活性を利用して糖鎖を転移する方法である。エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを用いた糖転移反応は多数の糖から構成される糖鎖を一度に転移できるので極めて有効である。エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの共通する酵素的性質は、次式〔IV〕：

【0007】

【化4】

BEST AVAILABLE



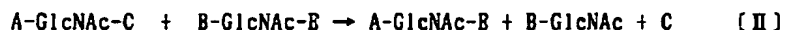
【0008】の矢印の位置を加水分解することである。しかし、糖転移活性は、この酵素の一般的な性質とは言えず、例えばストレプトマイセス プリカタス (*Streptomyces spicatus*)由来のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼHでは全く見いだされていない。さらに、アスパラギン結合型糖鎖の複合型を、広範囲な糖質あるいは複合糖質に転移できるエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼは現在までのところ知られていない。

【0009】例えば、エンドFの場合、アスパラギン結合型糖鎖のうち、高マンノース型、バイセクティングN-アセチルグルコサミンをもたない混成型、2本鎖複合型の転移は行なえるが、その他のものは転移できない。しかも、アクセプターとしてはグリセロールのみが利用可能といった問題点や利用の制限がある。また、エンドAの場合には種々のアクセプターを利用することができるが、本来の加水分解活性がアスパラギン結合型糖鎖の中の高マンノース型と混成型の一部の糖鎖に限られていることから〔アプライド アンド エンバイロンメンタル

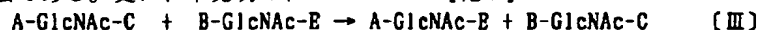
マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.)、第55巻、第3107~3112頁 (1989)〕、複合型糖鎖はドナーから切り出すことができず、転移反応が行えないと考えられる。従って、動物由来の糖タンパク質などの生産において、使用が制限されたり、あるいは使用が困難である等、利用上の問題点がある。

【0010】一方、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼMは、ムコール属に属する *Mucor hiemalis* SK-314の生産するエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼである。そして、糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖の高マンノース型、混成型、複合型のいずれも前記式〔IV〕の矢印の部分で分解するという触媒作用が、S.カドワキらによって報告されている〔アグリカルチュラ

アンド バイオロジカル ケミストリー (Agric. Bio l. Chem.)、第52巻、第2387~2389頁 (1988)〕。



【0018】(式中、A及びBは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、C及びEは糖質又は複合糖質を表す)で示される転移反応を行なうことを特徴とする糖質又は複合糖質の製造方法である。更に、本発明は、エン



【0020】(式中、A及びBは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、C及びEは糖質又は複合糖質を表す)で示される転移反応を行なうことを特徴とする糖質又は複合糖質の製造方法である。複合糖質としては、糖タンパク質、糖脂質又はプロテオグリカンが挙げられる。

【0021】また、糖質又は複合糖質に転移される糖鎖

【0011】しかし、この酵素が糖鎖の転移反応を触媒する活性を有することは知られていない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】上記諸問題に鑑み、糖鎖を糖質あるいは複合糖質に簡便に転移する方法、即ち、アスパラギン結合型糖鎖の高マンノース型、混成型、複合型など幅広い種類の糖鎖を一段階の反応で転移し、安定性や細胞認識などの物理化学的あるいは生理的性質を向上した糖質および複合糖質を合成する方法の開発が望まれていた。

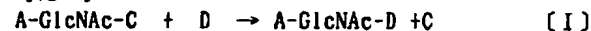
【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題について鋭意研究を行った結果、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼMが糖転移反応を触媒することを見だし、また、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼMの作用を利用することにより、種々多様な糖鎖を転移することが可能で、特にアスパラギン結合型糖鎖では高マンノース型、混成型、複合型のいずれをも転移することが可能な糖質および複合糖質のリモデリング法の開発に成功し、本発明を完成させた。

【0014】即ち、本発明は、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼMの存在下、次式〔I〕：

【0015】

〔化5〕



【0016】(式中、Aは糖質、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、C及びDは糖質又は複合糖質を表す)で示される転移反応を行なうことを特徴とする糖質又は複合糖質の製造方法である。また、本発明は、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼMの存在下、次式〔II〕：

【0017】

〔化6〕

ド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼMの存在下、次式〔III〕：

【0019】

〔化7〕

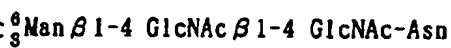
はアスパラギン結合型である。更に、糖質又は複合糖質に転移される糖鎖がアスパラギン結合型であって、その糖鎖は混成型又は複合型である。以下、本発明を詳細に説明する。本発明は、多種多様な糖質あるいは複合糖質をアクセプターとすることができ、かつ、様々な糖鎖を転移することが可能で、特に、アスパラギン結合型糖鎖では高マンノース型、混成型、複合型のいずれをも転移

することが可能な糖転移反応系を特徴とするものである。特に、複合型は構造変化に富み、動物でよく見いだされる糖鎖構造であり、生体内で重要な生理機能を担っているため、複合型糖鎖を転移できることは産業上、極めて意義深いものである。

【0022】前述の本発明の糖転移反応において、式【I】、【II】又は【III】中、A及びBは糖質を示し、マンノース、グルコース、N-アセチルグルコサミンなどから構成されるホモオリゴマー、あるいは、マンノース、グルコース、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、シアル酸などの2成分以上より構成されるヘテロオリゴマーである。これらの代表的な例として、糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖が挙げられる。アスパラギン結合型糖鎖とは、糖タンパク質のアスパラギン残基に結合する糖鎖をいう。

【0023】また、式【I】、【II】又は【III】中、C、D及びEは糖質又は複合糖質であり、例えばグルコース、マンノース、N-アセチルグルコサミンなどの単糖、これらの2単糖以上のホモオリゴマー、これら2成分以上から構成されるヘテロオリゴマーなどが挙げられる。また、これら糖質の α -および β -メチルグリコシド、 α -および β -p-ニトロフェニルグリコシド、O-メチルグリコシド、1-アミノグリコシド、4-メチルウムベリフェリルグリコシドなどの糖質及び、ビリジリアミノ化された糖質、また、これら糖質の末端にアスパラギン、発色物質あるいは蛍光物質などで標識されたアスパラギン、アスパラギンを介してポリペプチドが結合した複合糖質などでもよい。

【0024】更に、式【I】中、アクセプターであるDとしては、その非還元末端のC-4位が遊離である糖質あるいは複合糖質がよく反応し、C-4位が遊離の糖の中でも、そのC-4位およびC-5位の立体配座がN-アセチルグルコサミンと同じものがよい。従って、N-アセチルグルコサミン、グルコース、グルコサミン、N-アセチルマンノサミン、マンノース、マンノサミン、アロースなどの単糖、又はこれらの糖を非還元末端とする糖質あるいは複合糖質がよいアクセプターとなる。また、これら糖質の α -及び β -メチルグリコシド、 α -及び β -p-ニトロ



【V】

【0029】で示される化合物に、 α -p-ニトロフェニルグルコース (p-NP- α -Glc) を作用させて得られる次式【VI】:

フェニルグリコシド、O-メチルグリコシド、1-アミノグリコシド、4-メチルウムベリフェリルグリコシドなどの糖質及び、ビリジリアミノ化された糖質、あるいは、これら糖質にアスパラギン、セリン、トレオニンなどのアミノ酸、あるいは発色物質、蛍光物質、保護基などで修飾されたアスパラギン、セリン、トレオニンなどアミノ酸の結合した複合糖質にも作用する。

【0025】本発明の糖転移反応は、通常、ドナーとなる糖質あるいは複合糖質、アクセプターとなる糖質あるいは複合糖質、触媒となるエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼM (以下、エンドMとする)、及び緩衝液を含む反応液中で行なわれる。ドナーあるいはアクセプターの使用量は特に制限されず、飽和量まで使用できる。エンドMの使用量も特に制限されないが、反応溶液1ml当たり10mU~10U程度使用すればよい。緩衝液はpHが5~11程度の適当な緩衝液を用いればよく、通常はpH6.0付近でリン酸カリウム緩衝液を使用する。本発明の転移反応は、反応液に有機溶媒、無機塩類等を添加しても反応し、例えば水難溶性の糖質あるいは複合糖質に対しては、有機溶媒としてメタノールを使用することができる。この他、DMSO (ジメチルスルホキシド) やDM (N,N-ジメチルホルムアミド) なども使用できる。

【0026】本発明の転移反応は、通常室温~50℃程度、好ましくは30~40℃程度の温度下で行なわれ、その反応条件によるが、転移反応は数分から数十時間程度で終了する。生成されるリモデリング糖質あるいは複合糖質は、既に公知となっている方法によって反応終了液から容易に分離精製可能である。例えば、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーなどがその方法として挙げられ、さらに脱塩、濃縮、凍結乾燥などの操作により回収することができる。

【0027】本発明の方法で製造した糖質または複合糖質は、各種糖質分解酵素や糖転移酵素の基質となり、各種有用酵素の検索に用いることができる。特にアスパラギン結合型糖鎖のうち、複合型に関する酵素の基質を調製するのに有用である。例えば、次式【V】:

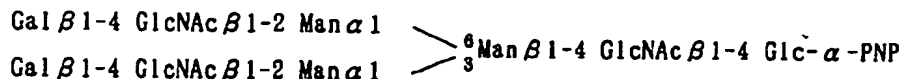
【0028】

【化8】

【0030】

【化9】

BEST AVAILABLE COPY



[VI]

【0031】で示される化合物は、試料中の複合型のアスパラギン結合型糖鎖を切断するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの検出および測定に用いることができる。即ち、試料中に目的の酵素が存在すれば、p-NP- α -Glcが遊離し、さらに α -グルコシダーゼを作用させれば遊離のp-ニトロフェノールが黄色を示し、ラジオアイソトープや蛍光光度計などを用いずに試料中の酵素活性を簡便に測定することができる。試料としては微生物、昆虫、動物、植物などの生物あるいはそれらの細胞培養液などが挙げられる。また、p-NP- α -Glcの代わりに、例えばX-Glc（5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-D-グルコシド）を用いることが可能で、この場合には青色を呈する。

【0032】また、例えば本発明のp-ニトロフェニル化糖質を還元し、p-アミノフェニル化糖質を調製し、その後活性化カルボキシルアガロースや臭化シアン活性化アガロースなどに結合させることにより、糖質が結合した担体を調製することができる。この糖質結合担体は各種糖質分解酵素、糖転移酵素、レクチンなどの精製に有用である。また、本発明で合成されるメチルグリコシド化糖質はエポキシ活性化アガロースなどに容易に固定化することが可能で、調製した糖質結合担体は前述と同様の目的で使用することができる。

【0033】

【発明の効果】本発明によれば、エンドMの触媒作用を利用することにより、従来の技術では困難であった種々多様な糖鎖を転移することが可能で、特にアスパラギン結合型糖鎖では高マンノース型、混成型、複合型のいずれをも転移することが可能な糖質および複合糖質のリモデリング法を提供することができる。

【0034】糖質あるいは複合糖質の糖鎖をリモデリングすることは、副作用の少ない医薬品などの開発、生産等に利用することから、産業上極めて有用である。

【0035】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【実施例1】 ヒト アシアロトランスフェリン糖鎖のGlcNAcへの転移反応

エンドMの精製は、S.カドワキら〔アグリカチュラル アンド バイオロジカル ケミストリー (Agric. Bio l. Chem.)、第54巻、第97-106頁(1990)〕によって報告されている方法に従って行なった。

【0036】 Mucor hiemalis SK-314をグルコース0.5%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.5%を含む液体培地

(pH 6.5)で28℃、3～4日間振とう培養し、限外濾過によって菌体を除いて培養濾液を得た。この培養濾液を粗酵素液として、CM-セルロース処理、70%飽和硫酸沈殿、DEAE-Sepharose、CL-6B Sephadex G-200、Hydroxylapatite、TSK-gel HW-65F、Con A-Sepharoseの合計5種類の各カラムクロマトグラフィーによる精製過程を経て精製標品を取得し、以下の実施例に使用した。該菌株は、Mucor hiemalis SK-314と表示し、工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM BP-4377として寄託されている。

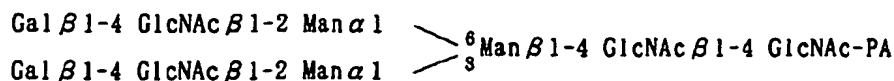
【0037】 2.5 mgのヒト トランスフェリン（シグマ社製）のアシアロ体、100mMのGlcNAc（ナカライテス社製）、66mMリン酸カリウム（和光純薬社製）緩衝液（pH 6.0）、32mUエンドMを含む反応液1.5mlを37℃で時間反応させた後、終濃度5%となるようにトリクロロ酢酸（和光純薬社製）を加えて反応を停止した。反応液はゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供した後、凍結乾燥し、以下のようにピリジルアミノ化（以下PA化と略記する）後、HPLC分析により転移生成物の同定を行った。

【0038】 100 μ lの2-アミノピリジン酢酸溶液〔276mg 2-アミノピリジン（和光純薬社製）/0.1ml酢酸（和光純薬社製精密分析用）〕を添加した後、密封して90℃で60分間加温し、一旦室温に戻した後、100 μ lの20%ジメチルアミン-ボラン酢酸溶液（2gジメチルアミン-ボラン（和光純薬社製）/10ml酢酸（和光純薬社製精密分析用））を加えてさらに80℃で50分間加温した。得られた反応液200 μ lに2mlの75%メタノールを加えて攪拌後、メタノールを減圧蒸留で除去し、さらに同様の操作を85%メタノールを用いて3～4回繰り返した。減圧濃縮物に飽和炭酸水素ナトリウム（和光純薬社製）水溶液、5%無水酢酸（和光純薬社製）水溶液を各500 μ l添加して攪拌後、10分間放置した。これに1.5mlのベンゼン（和光純薬社製）を加えて激しく攪拌した後、10分間放置し、上層のベンゼンを除き、さらに同様のベンゼン抽出を7回繰り返した。得られた水層を減圧蒸留した後、Sephadex G-10カラムによるゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供し、HPLC分析の試料とした。HPLC分析による糖鎖構造解析は、順相および逆相カラムを用いるN.トミヤら〔アナリティカル バイオケミストリー (Anal. Biochem.)、第171巻、第73-90頁(1988)〕の2次元マッピング法によって行なった。

【0039】 次式〔VII〕：

【0040】

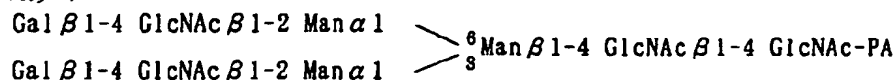
【化10】



〔VII〕

【0041】で示される市販の化合物（宝酒造社製）を標準物質として使用して比較した結果、転移生成物のPA化合物を、次式〔VII〕：

【0042】
【化11】



〔VII〕

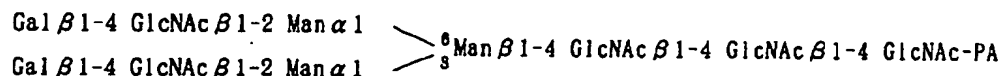
【0043】で示される化合物と同定した。

〔実施例2〕 ヒト アシアロトランスフェリン糖鎖の (GlcNAc)₂ への転移反応

0.5 mgのヒト トランスフェリン（シグマ社製）のアシアロ体、50mMの (GlcNAc)₂、67mMリン酸カリウム（和光純薬社製）緩衝液（pH6.0）、6.4mUエンドMを含む反応液0.3mlを37℃で6時間反応させた後、100℃にて3分間

加熱処理し、反応を停止した。反応液はゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供した後、凍結乾燥した。前述の実施例1と同様にPA化後、転移生成物を順相カラムを用いたHPLCで分析し、分子量の変化から、次式〔VIII〕：

【0044】
【化12】



〔VIII〕

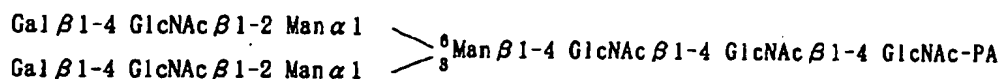
【0045】で示される化合物と同定した。次に、このPA化合物のMS分析を行い、その糖鎖構造を確認した。

〔実施例3〕 ヒト アシアロトランスフェリン糖鎖の (GlcNAc)₂ - PAへの転移反応

0.17 mgのヒト トランスフェリン（シグマ社製）のアシアロ体、2.2mMの (GlcNAc)₂ - PA、75mMリン酸カリウ

ム（和光純薬社製）緩衝液（pH6.0）、2.0mUエンドMを含む反応液0.1mlを37℃で6時間反応させた。反応液をMS分析し、転移生成物を次式〔VIII〕：

【0046】
【化13】



〔VIII〕

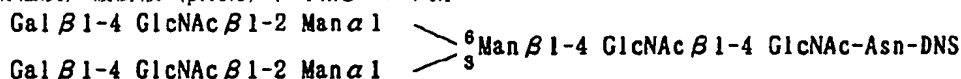
【0047】で示される化合物と同定した。

〔実施例4〕 ヒト アシアロトランスフェリン糖鎖の GlcNAc - Asn - DNSへの転移反応

0.15 mgのヒト トランスフェリン（シグマ社製）のアシアロ体、1 MのGlcNAc - Asn - DNS、67mMリン酸カリウム（和光純薬社製）緩衝液（pH6.0）、4 mUエンドM

を含む反応液0.145mlを37℃で30分間反応させた。反応液を逆相カラムを用いたHPLCで分析し、転移生成物が、次式〔IX〕：

【0048】
【化14】



〔IX〕

【0049】で示される化合物であることを確認した。

〔実施例5〕 2本鎖複合型糖鎖のp-NP- α -Glcへの転移反応

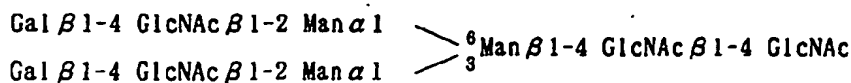
1 Mのp-NP- α -Glc（セン ケミカルズ社製）の水溶液3

0 μ lに、1 M酢酸緩衝液（pH6.0）を30 μ lとエンドMを0.14mU含む酵素液100 μ lと脱イオン水40 μ lを加え、3℃にて10分間予備インキュベーションした。ついで、次式〔X〕：

BEST AVAILABLE COPY

【0050】

【化15】



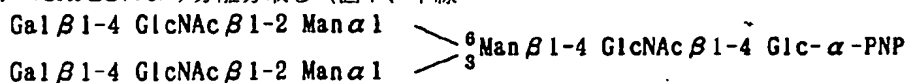
〔X〕

【0051】で示される100 μ l(60nmol)の2本鎖複合型糖鎖(バイオカーブ ケミカルズ社製)を添加し、37℃にて100分間反応させた後、100℃にて3分間加熱処理し、反応を止めた。反応液をPALPAK Type N カラム(宝酒造社製)を用いたHPLCにより分離分取し(図7、下線

の部分)、組成分析、NMR、およびMS分析を行い、その糖鎖構造が次式〔VI〕:

【0052】

【化16】



〔VI〕

【0053】で示される転移生成物であることを確認した。

【図面の簡単な説明】

【図1】アスパラギン結合型糖鎖において、高マンノース型糖鎖構造を示す図である。

【図2】アスパラギン結合型糖鎖において、混成型糖鎖構造を示す図である。

【図3】アスパラギン結合型糖鎖において、複合型糖鎖構造(1分枝型)を示す図である。

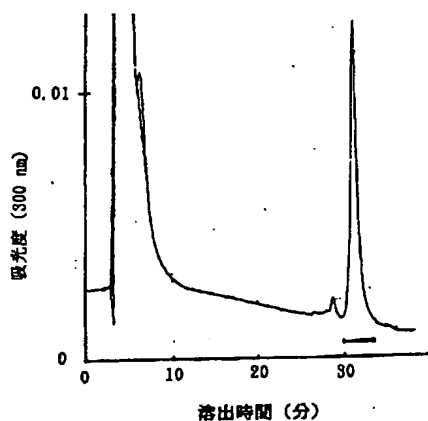
【図4】アスパラギン結合型糖鎖において、複合型糖鎖構造(2分枝型)を示す図である。

【図5】アスパラギン結合型糖鎖において、複合型糖鎖構造(3分枝型)を示す図である。

【図6】アスパラギン結合型糖鎖において、複合型糖鎖構造(4分枝型)を示す図である。

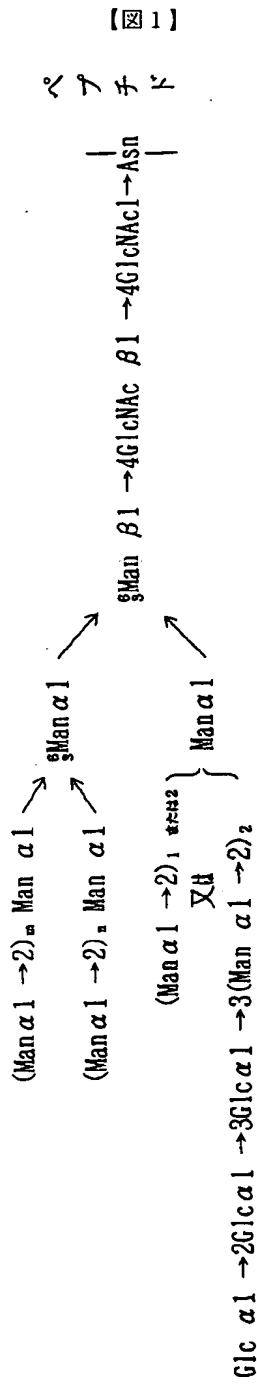
【図7】実施例5において、HPLCの結果を示す図である。

【図7】



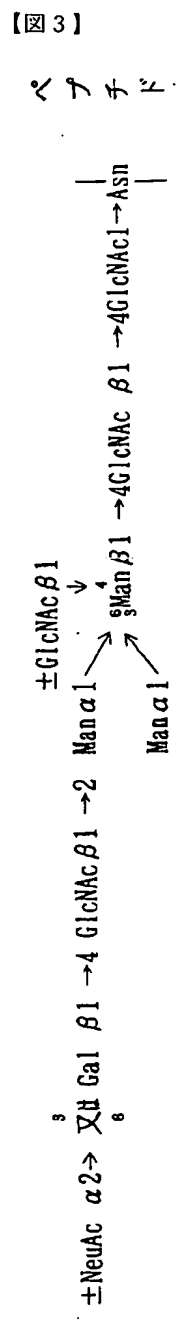
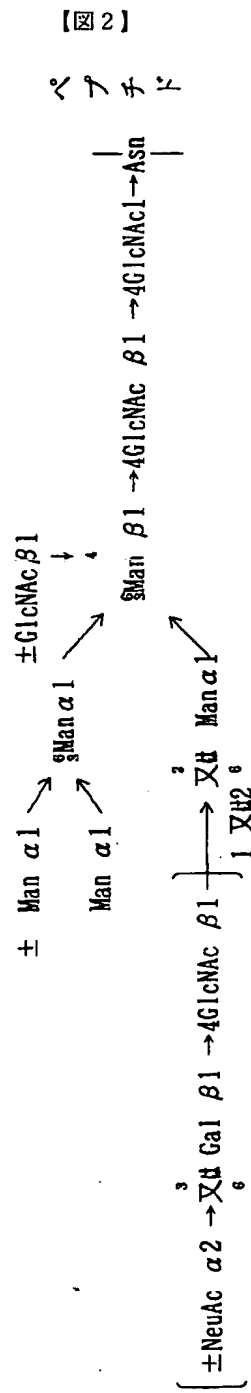
BEST AVAILABLE COPY

1. 高マンノース型

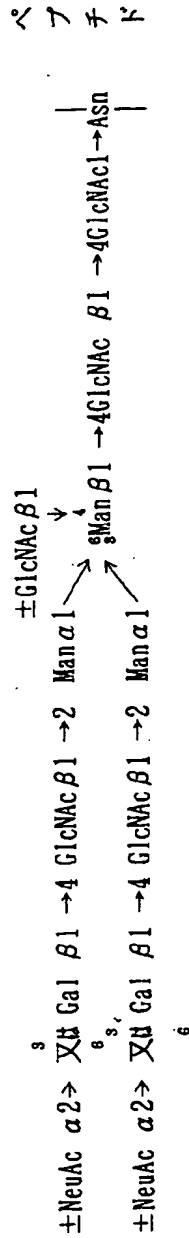


(m, nは、0又は正の整数を表す)

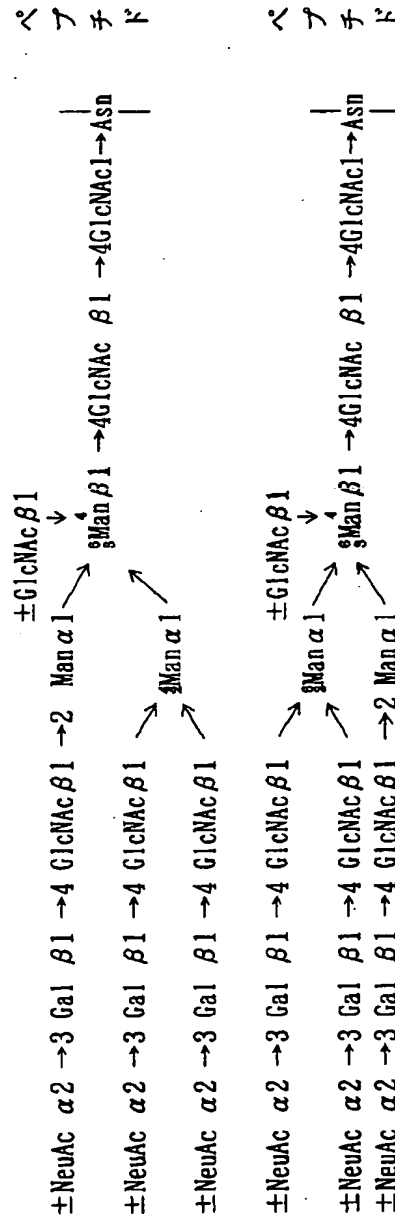
2. 混成型



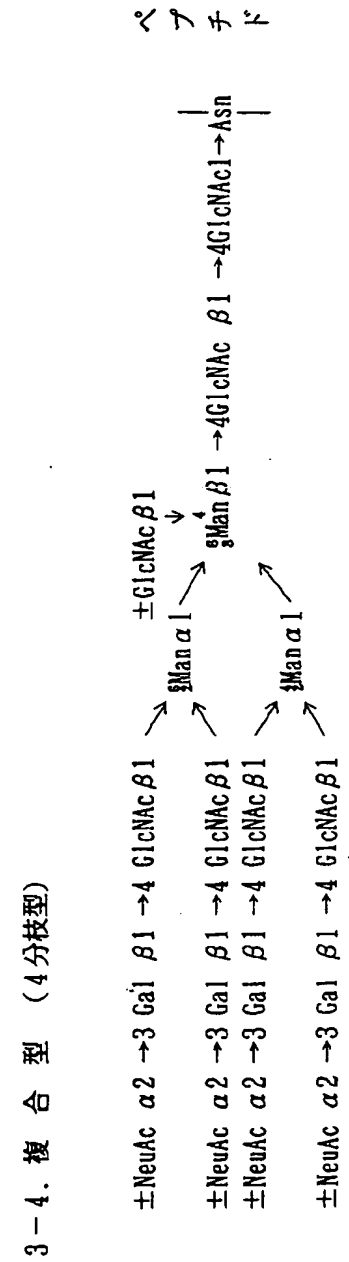
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(72)発明者 山本 慈二

滋賀県大津市中庄 1 丁目 17-14-403

BEST AVAILABLE COPY